



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

Efecto bactericida del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con Oxacilina a 1 µg.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO

AUTORA:

Rodríguez Sánchez, Susana Noelia (ORCID: 0000-0003-4778-7149)

ASESORES:

Dra. Goicochea Rios, Evelyn Del Socorro (ORCID: 0000-0001-9994-9184)

Mg. Blgo. Polo Gamboa, Jaime Abelardo (ORCID: 0000-0002-3768-805)

Dra. Otiniano García, Milly Esther (ORCID: 0000-0001-98384847)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

TRUJILLO - PERÚ

2020

Dedicatoria

El presente trabajo se lo dedico a mis papás por ser mi ejemplo de superación.

A mis abuelitos por haberme dejado un gran legado de sabiduría.

A mis seres queridos en el cielo por inspirarme a querer ser una gran profesional.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi familia por haberme alentado en todo momento.

A mi hermana y a mi chiqui por haberme acompañado en cada momento.

A mis amigos con quienes recorrí este largo camino.

A mis maestros, por ser inspiración en mi formación.

Índice de contenidos

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
III. METODOLOGÍA	5
3.1. Tipo y diseño de investigación	5
3.2. Variables y operacionalización	6
3.3. Población, muestra y muestreo	7
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad....	7
3.5. Procedimiento	7
3.6. Métodos de análisis de datos	8
3.7. Aspectos éticos	9
IV. RESULTADOS.....	9
V. DISCUSIÓN	11
VI. CONCLUSIONES	14
VII. RECOMENDACIÓN.....	14
REFERENCIAS	15
ANEXOS	

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción del efecto bactericida del extracto etanólico de <i>Phyllanthus niruri</i> a diferentes concentraciones sobre a <i>Staphylococcus aureus</i> comparado con oxacilina a 1 ug. Estudio in vitro	9
Tabla 2. Comparación de promedios de los halos de inhibición obtenidos con los diferentes tratamientos usando la prueba de Krustal Wallis	10
Tabla 3. Comparación de muestras y su nivel de significancia	11

Índice de gráficos y figuras

Figura 1. Efecto bactericida del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* a diferentes concentraciones contra *Staphylococcus aureus*, comparado con oxacilina a 1 ug..10

Resumen

El estudio busca establecer la actividad bactericida in vitro del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* sobre *Staphylococcus aureus* comparado con oxacilina a 1 ug. Se utilizó hojas secas de *Phyllanthus niruri*, alcohol etílico al 96% y tiras de oxacilina a 1 ug. Las diluciones utilizadas fueron de 25, 50,75 y 100% del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri*. Se realizaron 10 repeticiones por cada grupo, siendo un total de 60, mediante la técnica de Kirby Bauer se evaluó la eficacia bactericida. Todas las concentraciones tuvieron efecto bactericida contra *Staphylococcus aureus*. La concentración al 100% del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* obtuvo una media de los halos de inhibición de 29.9 mm (DE \pm 0. 876 IC 95% con valor mínimo de 29 mm y un valor máximo de 32 mm); y oxacilina obtuvo una media de 31.2 mm (DE \pm 0. 389 IC 95% con valor mínimo de 29 mm y máximo de 33 mm). Los datos obtenidos fueron analizados con la prueba de Kruskal Wallis, determinando que existe diferencia altamente significativa entre el efecto bactericida del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* y Oxacilina a 1ug ($p=0.00$).

Palabras clave: *Phyllanthus niruri*, extracto etanólico, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

The study seeks to establish the in vitro bactericidal activity of the ethanolic extract of *Phyllanthus niruri* on *Staphylococcus aureus* compared to oxacillin at 1 ug. Dried *Phyllanthus niruri* leaves, 96% ethyl alcohol and 1 ug oxacillin strips were used. The dilutions used were 25, 50.75 and 100% of the ethanolic extract of *Phyllanthus niruri*. 10 repetitions were carried out for each group, being a total of 60, by means of the Kirby Bauer technique the bactericidal efficacy was evaluated. All concentrations had a bactericidal effect against *Staphylococcus aureus*. The 100% concentration of the ethanolic extract of *Phyllanthus niruri* obtained a mean of the inhibition halos of 29.9 mm (SD \pm 0.876 95% CI with a minimum value of 29 mm and a maximum value of 32 mm); and oxacillin obtained a mean of 31.2 mm (SD \pm 0.389 95% CI with a minimum value of 29 mm and a maximum of 33 mm). The data obtained were analyzed with the Kruskal Wallis test, determining that there is a highly significant difference between the bactericidal effect of the ethanolic extract of *Phyllanthus niruri* and Oxacillin at 1ug ($p = 0.00$).

Keywords: *Phyllanthus niruri*, ethanolic extract, *Staphylococcus aureus*.

I. INTRODUCCIÓN

La flora gracias a sus propiedades medicinales ha sido utilizada a lo largo de los siglos para curar y aliviar determinadas enfermedades, las que poco a poco con ayuda de la tecnología han dado lugar a la fabricación de diversos fármacos.^{1,2} Si bien el empleo de hierbas y fármacos se consideran dos polos distintos, sin embargo, un estudio reflejó que al menos el 67% de estos últimos son originarios, en menor o mayor proporción, de la naturaleza; y aproximadamente el 25% son derivados de plantas.³

El Perú posee una amplia diversidad de plantas medicinales usadas de manera empírica por sus grandes beneficios terapéuticos para prevenir y restaurar la salud entre ellas están sus propiedades antibacterianas.⁴

Phyllanthus es un gran género de arbustos de la familia Euphorbiaceae, que abarca más de 600 especies que son investigadas por sus propiedades fotoquímicas y farmacológicas. Entre las especies de *Phyllanthus*, *Phyllanthus niruri* es conocida popularmente como “Chancapiedra”, “piedra con piedra” o “quinina criolla”. Tiene varias moléculas bioactivas como vitamina C, lignanos, esteroides, flavonoides, terpenos, triterpenos, benzenoides, alcanos, alcaloides indolizidínicos, alcaloides, alcaloides pirrolizidínicos, lípidos, salicilato de metilo y taninos.⁷

El *Staphylococcus aureus*, característicamente es una bacteria catalasa y Gram positiva, no móvil, anaerobia facultativa, cuya fuente de carbono es el manitol y se desarrolla en presencia de NaCl.⁸ Figura como uno de los mayores causantes de infecciones por bacterias en todo el mundo, generadora de enfermedades que abarcan infecciones de piel, osteomielitis, endocarditis hasta la mortal sepsis.⁹

Los betalactámicos (p.e. penicilinas y cefalosporinas) son antibióticos que destruyen a la bacteria al inactivar las proteínas de unión a penicilina (PBP), imprescindibles para formar la pared bacteriana.¹⁰ Los *Staphylococcus* tienen la proteína betalactamasa que se une al anillo betalactámico, confiriendo resistencia a la penicilina, más no a las aminopenicilinas.¹¹

El aumento de las infecciones por *Staphylococcus aureus*, conlleva a usar aminopenicilinas como oxacilina; sin embargo, su uso es cada vez más limitado por la resistencia bacteriana que algunas cepas crean debido al uso indiscriminado de este antibiótico;¹² por esta razón encontrar formas alternativas de tratamiento antes de usar antibióticos para tratar las infecciones contribuiría a reducir el riesgo de resistencia en los pacientes.¹³

El Ministerio de salud peruano informó que la infección por *Staphylococcus aureus* es una de las más frecuentes y peligrosas a nivel nacional, responsable de infecciones de herida operatoria en un 33%, seguido por infecciones al torrente sanguíneo en un 13%, y por último, del 11% de neumonías.¹⁴

Por tal motivo y en base a la realidad antes expuesta se formuló el siguiente problema: ¿Posee efecto bactericida el extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con oxacilina, en estudio in vitro?

El último año se ha visto la escasez de recursos farmacológicos a causa de la pandemia, por tanto, es de suma importancia investigar las propiedades que puedan tener diferentes variedades de plantas disponibles en nuestro medio, así como hallar una base científica que respalde el uso de la medicina alternativa y sean bases para la creación de nuevos fármacos para la medicina convencional.

Es importante considerar a la medicina alternativa como una opción inicial antes del uso de antibióticos, manteniendo como fin lograr el tratamiento adecuado del paciente; además puede favorecer la disminución de la resistencia bacteriana y ser más accesible a la economía de la población por ser plantas silvestres que ayudarían a combatir algunas infecciones.

Diferentes estudios a lo largo del mundo han demostrado que *Phyllanthus niruri* tiene efecto antibacteriano contra diferentes agentes, sin embargo, es importante establecer si es similar a oxacilina, actualmente uno de los medicamentos eficaces en el tratamiento de las infecciones por *Staphylococcus aureus*.

El objetivo general fue determinar el efecto bactericida del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* frente a *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 comparado con oxacilina, en estudio in vitro.

Y los objetivos específicos: Comparar la eficacia bactericida del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* al 100%, 75%, 50% y 25% sobre *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923; y comparar el efecto bactericida de la Oxacilina sobre *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923.

La hipótesis de investigación fue: El extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* tiene efecto bactericida sobre *Staphylococcus Aureus* comparado con Oxacilina a 1 ug en estudio In Vitro.

II. MARCO TEÓRICO

Divya K et al¹⁵ (India, 2018), empleando el ensayo de antioxidante total, la actividad de eliminación de DPPH y el ensayo de reducción de potencia mostraron el contenido cuantitativo de fenol y flavonoides de *Phyllanthus niruri*. Utilizando extracto etanólico y acetona a la concentración de 80 y 100%, demostraron que el extracto etanólico tiene mejores efectos antibacterianos que la acetona, además del alto potencial antioxidante que la planta posee.

Ramandeep K et al¹⁶ (India, 2017), tras realizar un análisis fitoquímico cualitativo revelaron la presencia de glucósidos, polisteroles taninos, diterpenos cardíacos y la presencia parcial de alcaloides y carbohidratos; las propiedades antioxidantes se evaluaron accediendo al efecto de eliminación de radicales DPPH. La actividad antimicrobiana del extracto se probó contra los aislamientos de 5 bacterias, entre ellas *Staphylococcus* sp. Encontraron gran actividad fitoquímica, antioxidante y antimicrobiana, siendo el extracto de etanol el que mostró mejor efecto inhibidor en *Staphylococcus* sp.

Kurhekar J et al¹⁷ (India, 2013), centraron su estudio en el potencial antimicrobiano de los extractos de acetona y acuoso de *Phyllanthus niruri*, y usaron como control a Lomefloxacino. Emplearon la difusión de disco para determinar la sensibilidad. La zona de inhibición del extracto acuoso fue de 19.83 ± 1.16 para *Phyllanthus niruri*

frente a 20 ± 1.41 de Lomefloxacin (30 μ g) ($p < 0.05$). Así identificaron que el extracto acuoso es más eficaz que el de acetona, y a la vez tiene un efecto antimicrobiano similar a lomefloxacin tras compararlos.

Ibrahim D et al¹⁸ (Nigeria 2013), evaluaron la eficacia antibacteriana del extracto metanólico de *Phyllanthus niruri* en diferentes bacterias, entre ellas *Staphylococcus aureus*, y usando como control al cloranfenicol. Con una concentración de 100 mg/mL obtuvieron una zona de inhibitoria de 15 mm demostrando así la eficacia antibacteriana de *Phyllanthus niruri*.

Obiagwu I et al¹⁹ (Nigeria, 2011), realizaron estudios a partir del extracto etanólico de las hojas de *Phyllanthus niruri* sobre la inhibición de *Staphylococcus aureus*, a diferentes concentraciones, de 25, 50, 100, 200 y 400 mg/mL y usando como control positivo a gentamicina; obtuvieron una zona de inhibición de 9, 9, 9, 14 y 16 mm respectivamente; con un $p < 0.05$, revelando la gran significancia de la planta como antibacteriano, pero menor al logrado por gentamicina.

Uchechi N et al²⁰ (Nigeria, 2006), estudiaron el efecto antibacteriano de *Phyllanthus niruri* sobre diferentes bacterias, entre ellas el *Staphylococcus aureus*, donde el extracto etanólico tenía un halo de inhibición de 14 mm a una concentración de la planta de 1000 mg mL.

A nivel nacional y local no se encontraron estudios que evalúen el efecto antibacteriano de *Phyllanthus Niruri*.

La familia Euforbacea, se distribuye a lo largo de las selvas tropicales del Amazonas y otras como la Bahamas India, Pakistán y, China. En Perú 9 tipos son nativas, entre las que figura *Phyllanthus niruri* cuya composición fitoquímica contiene lignanos, esteroides, flavonoides, terpenos, triterpenos, benzenoides, alcanos, alcaloides indolizidínicos, alcaloides, alcaloides pirrolizidínicos, lípidos, salicilato de metilo y taninos. ⁶

Químicamente está compuesto por phyllanthine brevifolina, quercitrin, tricontanol, quercetol, niruretin, ácido carboxílico, nirurin, norsecurinines, corilagin, cymene, niranin, ácido repandusinic, quercetin, nirtetralin, ellagitannins, geraniin, niruride,

hypophyllanthin, lignanos, lintetralins, rutin, ácido elláxico, filocrisina, phylltetralin, lupeols, metil salicilato, nirurine, galocatequinas, astragalina, phyllanthanol, saponinas y triacontanal.⁷

La actividad antibacteriana de *Phyllanthus niruri* es gracias a la saponina, químico que tiene el potencial de modular el crecimiento microbiano, no solo de *Staphylococcus aureus*, sino de otras bacterias Gram positivas y algunos Gram negativas, sensibles y algunos resistentes a fármacos.^{21, 22}

Staphylococcus aureus o estafilococo dorado, pertenece a la familia Staphylococcaceae, es una bacteria gram positiva y coagulasa positiva. Morfológicamente son células esféricas de 1 µm de diámetro, agrupados por lo general en racimos irregulares como los racimos de uvas. Es de tipo anaerobio facultativo, reproduciéndose rápidamente a 37° C, excepto las cepas *Staphylococcus aureus anaerobius* y *Staphylococcus aureus saccharolyticus*.²³

El daño que producen los betalactámicos sobre el *Staphylococcus aureus* se debe a la inactivación de una o más de las 4 proteínas de unión a penicilina (PBP), transpeptidasas imprescindibles para la configuración de la pared celular. La unión irreversible del antibiótico, gracias a su homología estructural, con el dipéptido terminal D-alanina-D-alanina, sitio activo de las PBPs, favorece la hidrólisis del complejo.²⁴ La proteína b-lactamasa del *Staphylococcus* se fija al anillo betalactámico, generando gran resistencia a la penicilina.²⁵

El uso inescrupuloso de antimicrobianos ha implicado el surgimiento de una nueva cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), germen nosocomial, y en algunos países también de la comunidad, con alto porcentaje de morbilidad, por lo que la alta incidencia supone desarrollar nuevos medicamentos y destinar más recursos para la atención médica.²⁶

III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de investigación

Tipo de Investigación: Aplicada.

Diseño de Investigación: Experimental con repeticiones múltiples, post prueba.²⁷

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5
RG6	X6	O6

Entonces:

R: determinados al azar.

RG: grupos de estudio para la cepa.

X: Concentración del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri*

X1: 25%

X2: 50%

X3: 75%

X4: 100%

X5: Control positivo: Oxacilina a 1µg.

X6: Control negativo: Solución fisiológica

O: medición del halo de inhibición.

3.2. Variables y operacionalización

VARIABLE INDEPENDIENTE CUALITATIVA:

- Tratamiento alternativo
- Tratamiento farmacológico

VARIABLE DEPENDIENTE CUALITATIVA:

- Efecto antibacteriano en *Staphylococcus aureus*

3.3. Población, muestra y muestreo

Población:

Cepas de *Staphylococcus aureus* que fueron procesadas en el laboratorio.

- **Criterios de inclusión:**

- Cultivos viables de cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Extracto etanólico de *Phyllanthus niruri*

- **Criterios de exclusión:**

- Placas Petri contaminadas.

Muestra: Fue obtenida por conveniencia. Se utilizó la fórmula de diferencia de promedios, se calculó el número de repeticiones igual a 10 (ANEXO 3).

Unidad de análisis: Cada una de las cepas que fueron sembradas.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad

TÉCNICA:

Fue la observación del crecimiento bacteriológico, leyendo los halos de inhibición y evaluando la técnica de cada cultivo.

INSTRUMENTO:

El instrumento fue una tabla donde se registraron el número de cada placa, concentraciones y la medida en milímetros de cada halo de inhibición tras la observación en 24 horas (ANEXO 3).

3.5. Procedimiento

La legitimación de la planta se hizo por el Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo.

El extracto etanólico se obtuvo por el método de maceración, previamente se pulverizarán las hojas de *Phyllanthus niruri* hasta obtener un total de 20 g de polvo

(pesado en balanza electrónica). Se colocó 10g con 100 ml de agua destilada en cada matraz, tras macerarlo por 72 horas, se centrifugo a 50°C por 10 minutos. Por último, fue refrigerado a 4° C hasta que se utilizó.

La dilución se realizó con dimetilsulfoxido (DMSO) como un solvente, para el 100% se usó 100 ul de extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* a una proporción de 1:1, para 75% la proporción fue de 3:4, para 50% de 1:2, y para 25% fue de 1:4.

Tras cultivar las cepas de *Staphylococcus aureus*, se diluyó 4 colonias de *Staphylococcus aureus* en 3 mL con el fin de obtener turbidez y suspensión, según la escala de Mc Ferland a 0.5.

La siembra se realizó en placas Petri con Agar Muller Hinton, esparciendo uniformemente 0.1 mL de dilución de las colonias de *Staphylococcus aureus*. Luego se colocaron discos de papel filtro Whatman previamente empapados con extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* a diferentes concentraciones y discos de amoxicilina a 1 ug.³¹

La incubación de las placas cultivadas se hizo a 37 °C por 24 horas. El suero fisiológico sirvió como control positivo. Luego se revisó cada placa para verificar los halos de inhibición, interpretar y evaluar la sensibilidad con la técnica de Kirby Bauer³³. Finalmente, los resultados fueron registrados en la tabla de recolección de datos (ANEXO 2) y tabulados en una hoja Excel.

Se realizó el experimento bajo los procedimientos de bioseguridad establecidos por la OMS.³⁴ Usando los equipos de bioseguridad y aplicando las normas de bioseguridad en todos los procedimientos realizados.³⁴

3.6. Métodos de análisis de datos

Mediante la estadística descriptiva se analizó los datos con el fin de concluir el comportamiento de las variables. El análisis de datos se realizó con el programa SPSS versión 25 para Windows.

Como pruebas estadísticas se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk que evidenciaron que los datos no siguen una distribución normal, razón por la cual se

empleó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para muestras independientes (ANEXO 4). El intervalo de confianza fue de 95%.

3.7. Aspectos éticos

Los resultados corresponden a los hallazgos del experimento y no fueron alterados por conveniencia.³⁵ Se cumplió con los criterios para la protección de la biodiversidad establecidos en la Ley forestal y de fauna silvestre, Ley N° 29763, en su artículo 24³⁶

IV. RESULTADOS

TABLA 1. Descripción del efecto bactericida del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* a diferentes concentraciones sobre a *Staphylococcus aureus* comparado con Oxacilina a 1 ug. Estudio In Vitro

Concentración	N	Media (mm)	Desviación estándar	Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
25%	10	27,20	,789	,249	26,64	27,76	26	28
50%	10	27,90	,876	,277	27,27	28,53	26	29
75%	10	28,40	,699	,221	27,90	28,90	27	29
100%	10	29,90	,876	,277	29,27	30,53	29	32
Oxacilina	10	31,20	1,229	,389	30,32	32,08	29	33

Fuente: Ficha de recolección de datos de la investigadora, 2020

La tabla 1 muestra la media de los halos de inhibición alcanzados según la aplicación del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* a diferentes concentraciones siendo el valor más alto el alcanzado por la concentración del 100% con una media de los halos de medición de 29.9 mm, y Oxacilina con una media de 31 mm, siendo este el más alto de todos los antes descritos.

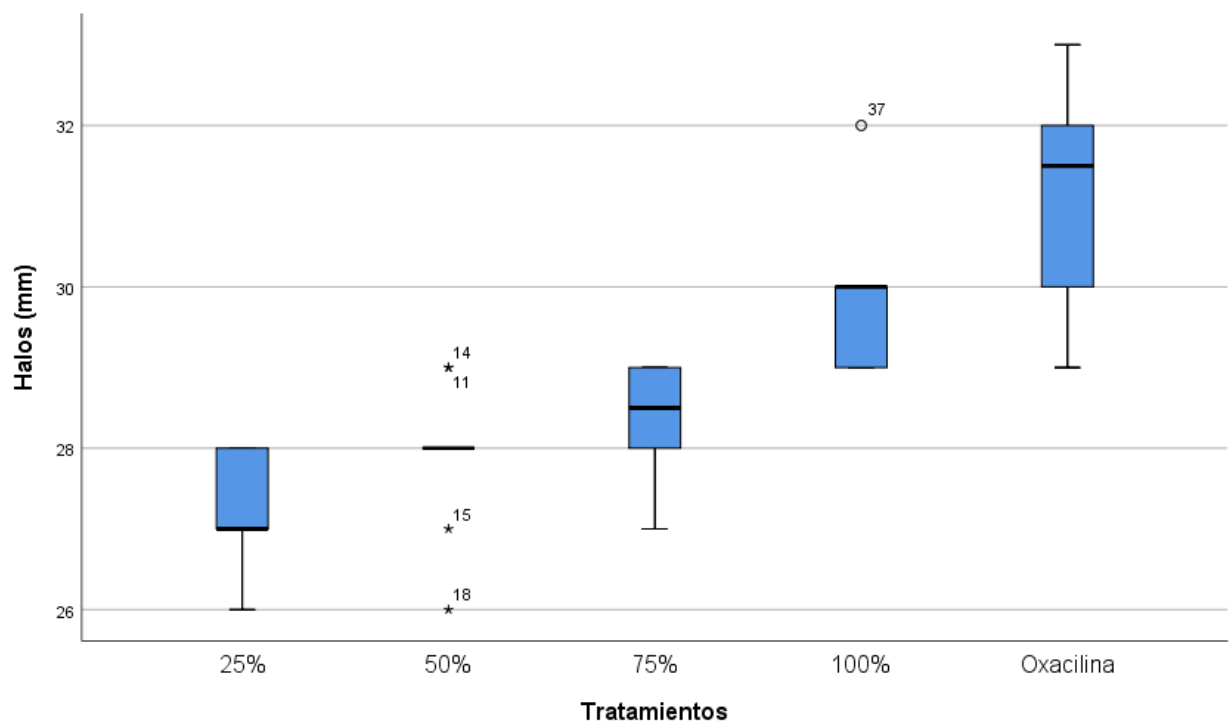
TABLA 2. Comparación de promedios de los halos de inhibición obtenidos con los diferentes tratamientos usando la prueba de Kruskal Wallis

N total	50
Estadístico de prueba	38,098 ^a
Grado de libertad	4
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,000

a. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.

Fuente: Ficha de recolección de datos de la investigadora, 2020

En la tabla 2 se evidencia que hay diferencia significativa entre los diámetros de los halos de inhibición por alcanzar una significancia $p < 0.05$, por lo que podemos concluir que hay diferencia significativa entre los promedios de los halos de inhibición obtenidos con los diferentes tratamientos.



Fuente: Ficha de recolección de datos de la investigadora, 2020

FIGURA 1. Efecto bactericida del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* a diferentes concentraciones contra *Staphylococcus aureus*, comparado con Oxacilina a 1 ug

La Figura 1 muestra que la media de los halos de inhibición de la concentración al 100% de *Phyllanthus niruri* coincide con el valor mínimo de los halos obtenidos con Oxacilina a 1ug.

TABLA 3. COMPARACIÓN DE MUESTRAS Y SU NIVEL DE SIGNIFICANCIA

Sample 1-Sample 2	Estadístico de prueba	Desv. Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajustada ^a
25%-50%	-6,950	6,390	-1,088	,277	1,000
25%-75%	-12,150	6,390	-1,901	,057	,572
25%-100%	-26,900	6,390	-4,210	,000	,000
25%-Oxacilina	-33,500	6,390	-5,243	,000	,000
50%-75%	-5,200	6,390	-,814	,416	1,000
50%-100%	-19,950	6,390	-3,122	,002	,018
50%-Oxacilina	-26,550	6,390	-4,155	,000	,000
75%-100%	-14,750	6,390	-2,308	,021	,210
75%-Oxacilina	-21,350	6,390	-3,341	,001	,008
100%-Oxacilina	-6,600	6,390	-1,033	,302	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son iguales.

Se visualizan las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es de ,05.

a. Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección Bonferroni para varias pruebas.

Fuente: Ficha de recolección de datos de la investigadora, 2020

En base a la tabla 3 se puede concluir que la concentración de extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* al 100% y de Oxacilina a 1ug tienen efecto bactericida similar ($p > 0.05$).

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación es un estudio experimental in Vitro que compara el efecto bactericida del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con Oxacilina a 1ug.

Para demostrar la acción bactericida se probaron diferentes concentraciones del extracto etanólico para encontrar alguna relación entre la cantidad del compuesto activo y su acción antibacteriana, por eso el número de repeticiones fue de 10 por cada concentración y grupo de control.

La Tabla 1 refleja que todas las concentraciones del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* tienen efecto bactericida, superando a los valores establecidos por el CLSI (>13 mm). La media de la concentración al 100% (29.9 mm) supera los valores obtenidos por Obiagwu, et al¹⁹, quienes reportaron que los halos de inhibición de *Stafilococcus aureus* generados a la concentración de 400% de *Phyllanthus niruri* (16 mm), fueron inferiores que su control positivo, gentamicina que alcanzó un valor de 40 mm; de la misma forma Uchechi, et al²⁰ compararon la eficacia del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* sobre *Stafilococcus aureus*, logrando halos de inhibición de 14 mm y como control positivo tuvieron a penicilina que logró un halo de inhibición de 14.5 mm.

La tabla 2 establece que hay diferencia significativa entre la media de los halos de inhibición de *Stafilococcus aureus* ATCC 25923 ($p < 0.05$), esta información era importante para determinar que la concentración del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* influye en el efecto bactericida. La figura 1 representa la diferencia entre las medias de las diferentes concentraciones y las compara con oxacilina a 1 ug. La concentración de *Phyllanthus niruri* al 100% logró el mayor halo de inhibición (29.9 mm), pero no superó al de Oxacilina (31.2 mm).

En esta investigación se demostró que existe efecto bactericida del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri*, coincidiendo con las investigaciones realizadas por Obiagwu, et al¹⁹ y Uchechi, et al²⁰, sin embargo, este efecto no supera al obtenido por otros antibacterianos como aminopenicilinas.

Uchechi et al²⁰ compararon los halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* formados por los extractos acuoso y etanólico de *Phyllanthus niruri* (11 mm y 14 mm respectivamente), Kurhekar J, Bodhankar K¹⁷ experimentaron con el extracto acuoso de *Phyllanthus niruri* sobre *Staphylococcus aureus*, y los halos de inhibición que obtuvieron fueron de 19.83 ± 1.16 mm. En la presente investigación, el extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* a la concentración de 25, 50, 75 y 100% logró una

media de los halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de 27.2, 27.9, 28.4 y 29.9 mm respectivamente, por lo tanto, el efecto bactericida del extracto etanólico es superior al extracto acuoso aún a concentraciones de 25%.

El efecto bactericida de *Phyllanthus niruri* se atribuye a diferentes compuestos con alta eficacia antibacteriana, como se menciona en diversos estudios, entre ellos la investigación de Ajibade et al ²² quienes atribuyen el efecto antibacteriano de *Phyllanthus Niruri* a la saponina, con efecto citotóxico capaz de destruir la pared bacteriana.³⁸ Así mismo, Quinto E ³⁷ demostró la presencia de terpenos los que probablemente intervendrían en la acción bactericida de *Phyllanthus niruri* y Samali et al ⁴² atribuyen el efecto antibacteriano a los taninos, los que permeabilizan la pared bacteriana y generan su destrucción.

Los estudios reflejan el efecto bactericida de *Phyllanthus niruri*; como se menciona en el párrafo anterior, sin embargo, los halos de inhibición del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* peruano sobre *Staphylococcus aureus* son mayores a los resultados presentados en otros países.¹⁹⁻²² Esto probablemente se debe a que existe una variación entre la concentración de metabolitos según diversos factores como clima, la tierra en la que crece, luz, etc. Debi U et al ⁴⁰, en su investigación concluyeron que el efecto antibacteriano de *Phyllanthus niruri* estaba relacionado con los lugares en dónde crecía la planta. En Perú el *Phyllanthus niruri* se encuentra en la región de Cuzco, Loreto, San Martín, Cajamarca y principalmente en toda la Amazonía, entre los 500 a 3,000 msnm.⁶

Phyllanthus niruri es empleada por comunidades rurales de costa, sierra y selva del Perú, para tratar diferentes males de forma empírica, por ser de bajo costo, y a la vez tener dificultades o limitaciones para el acceso oportuno a medicamentos.³⁹ Para millones de personas, los tratamientos basados en la flora podrían significar la única fuente de atención sanitaria, por ser accesibles y asequible frente al encarecimiento de la atención sanitaria y de los fármacos, además de respaldarse en la cultura y tradición.⁴¹ Por tal motivo es un nuevo punto de partida para futuras investigaciones relacionadas a *Phyllanthus niruri* ya que no existen en la literatura revisada, estudios enfocados en demostrar y comparar sus propiedades antibacterianas.

La presente investigación ha demostrado la eficacia bactericida contra *Staphylococcus aureus* del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri*, además de ser una buena forma de aprovechar sus propiedades químicas comparado con otras formas de preparación, por lo tanto, es una base científica que respalda su uso en la medicina complementaria y alternativa,⁴¹ siendo por ello importante ampliar los estudios con el fin comparar las diversas formas de extracción y utilización.

VI. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* mostró efecto bactericida frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- El extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* tuvo eficacia bactericida a las concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25% sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- El extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* a la concentración de 100% obtuvo halos de inhibición mayores que el resto de concentraciones.
- Oxacilina a 1ug In Vitro tuvo mayor efecto bactericida que *Phyllanthus niruri* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

VII. RECOMENDACIÓN

- Es importante promover la realización de estudios experimentales sobre los efectos antibacterianos de *Phyllanthus niruri* frente a otras bacterias, ya que varios estudios extranjeros revelan su alta eficacia antibacteriana inclusive contra algunas cepas resistentes.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Departamento de Medicamentos Esenciales y Política Farmacéutica. Ginebra: OMS; 2019. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/.
2. Casamayor P. Pérez Y, Morales I, Castellanos I, González E. Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. MEDISAN, Octubre 2014 [citado 24 de jul 2019]; 18 (10). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192014001000019&lng=es.
3. Gallegos M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. An. Fac. Med. [Internet]. 2016 Oct [citado 24 jul 2019]; 77(4): 327-332. Disponible desde: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832016000400002&lng=es.
4. Condori M. Evaluación de la actividad antimicótica de los aceites esenciales de plantas aromáticas. Rev Cien Inv And [Internet]. 2014 Jul [citado 24 jul 2019]; 14(2). Disponible desde: <https://revistas.uancv.edu.pe/index.php/RCIA/article/view/43>
5. Singh R, Anju P, Krishan P. Antimicrobial activity of *Phyllanthus niruri* against different human pathogenic bacterial strains. WJ PR [internet] 2016 Oct. [citado 19 ago 2019]; 5(3). Disponible desde: https://www.researchgate.net/publication/297174323_ANTIMICROBIAL_ACTIVITY_OF_PHYLLANTHUS_NIRURI_AGAINST_DIFFERENT_HUMAN_PATHOGENIC_BACTERIAL_STRAINS
6. Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual. Boletín de la Comisión Nacional Contra la Biopiratería. Perú: Indecopi; 2014. Disponible desde: https://www.indecopi.gob.pe/documents/20182/143803/boletin_intro_chancapiedra.pdf
7. Krishna Satya A. *Phyllanthus niruri*: A Review on its Ethno Botanical, Phytochemical and Pharmacological Profile. WJ PR [internet]; 2014 Sep

- [citado 19 ago 2019]; 5(9). Disponible desde: https://www.researchgate.net/profile/A_Satya/publication/259758390_Phyllanthus_niruri_A_Review_on_its_Ethno_Botanical_Phytochemical_and_Pharmacological_Profile/links/54268ca20cf2e4ce94070dfb/Phyllanthus-niruri-A-Review-on-its-Ethno-Botanical-Phytochemical-and-Pharmacological-Profile.pdf
8. Tamariz J, Agapito J, Horna G, Tapia E, Vicente W, Silva M, et al. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Perú. *Rev Med Hered* [internet]; 2010 Ene [citado 25 jul 2019]; 21(1): 4-10. Disponible desde: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2010000100002&lng=es.
 9. Cervantes E, García R. Importancia de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente intrahospitalario y adquirido en la comunidad. *Rev Mex Patol Clin Med Lab* [internet]. 2014 May [citado 28 jul 2019]; 61(4). Disponible desde: <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt144a.pdf>
 10. Mac Dougall C, Laurence B. Goodman y Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. 13° ed. México: Panamericana; 2019.
 11. The Center for food security and public health. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. The Center for food security and public health. 2011. Disponible en: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/mrsa-es.pdf>
 12. Ensinck G, Ernst A, Lazarte G, Firpo Veronica, Caruso Martín, Lución M, et al. Infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad: experiencia de 10 años en un hospital pediátrico de Rosario, Argentina. *Arch Argent Pediatr* [internet]. 2018 [citado 5 ago 2019]; 116(2):119-125. Disponible desde: https://www.sap.org.ar/uploads/archivos/files_ao_ensinck_9-2-18pdf_1518198817.pdf
 13. Rodríguez P, Terrazas E, Urdez H, Hernández S, Sánchez E, Sánchez S. Resistencia a meticilina y susceptibilidad a vancomicina de *Staphylococcus aureus* aislados de sangre. *Med Inst Mex Seguro Soc* [internet]. 2016 [citado 15 sep 2019]; 54(1):48-51. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2016/im161h.pdf>

14. Oficina General de Epidemiología. Análisis de Situación de las Infecciones Intrahospitalarias en Perú. OGE - RENACE / Vig. Hosp. DT 001 - 2000 V.1 Ministerio de Salud del Perú (MINSA). Perú: OGE; 1996. Disponible en: http://bvs.minsa.gob.pe/local/oqe/237_oqe29.pdf
15. Divya K, Anagha G, Duth B, Jyoti B. A study on the phytochemical and antibacterial activity of *Phyllanthus niruri* against the isolates of poultry feeds. J Pharmacogn Phytochem [internet]. 2018 [citado 23 sep 2019]; 7(3): 910-916. Disponible en: <http://www.phytojournal.com/archives/2018/vol7issue3/PartM/7-2-532-881.pdf>
16. Ramandeep K, Nahid A, Neelabh C, Navneet K. Phytochemical Screening of *Phyllanthus niruri* collected from Kerala Region and its Antioxidant and Antimicrobial Potentials. J. Pharm. Sci. & Res [internet]. 2017 [citado 25 sep 2019]; 9(8): 1312-1316. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/320035860_Phytochemical_Screening_of_Phyllanthus_niruri_collected_from_Kerala_Region_and_its_Antioxidant_and_Antimicrobial_Potentials
17. Kurhekar J, Bodhankar K. Antimicrobial activity of *Phyllanthus niruri*. IJNPR [internet]. 2009 Jun [citado 30 sep 2019]; 9. Disponible desde: https://www.researchgate.net/publication/230688584_Antimicrobial_activity_of_Phyllanthus_niruri
18. Ibrahim D, Hong L, Kuppan N. Antimicrobial Activity of Crude Methanolic Extract from *Phyllanthus niruri*. Natural Product Communications [Internet]. 2013 Abr [citado 30 sep 2019];8(4). Disponible desde: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1300800422>
19. Obiagwu I, Okechalu O, Njoku M. Studies on Antibacterial Effect of The Leaves Of *Phyllanthus Niruri* on Some Enteric Pathogens. Nigerian Journal of Biotechnology [Internet]. 2011 [citado 2 oct 2019];23: 22-27. Disponible desde: <https://www.ajol.info/index.php/njb/article/view/104524>
20. Uchechi N. Ekwenye U, Njoku U. Antibacterial Effect of *Phyllanthus niruri* (Chanca Piedra) on Three Enteropathogens in Man. International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences [internet]. 2006 [citado 30 sep 2019]

- 2019); 2: 184-189. Disponible en: <http://medwelljournals.com/abstract/?doi=ijmmas.2006.184.189>
21. Ajibade V, Oluwasusi V, Ibiyemi M, Ajennifuja O, Famurewa O. Antibacterial Activity of Saponin Extracted from *Phyllanthus niruri* on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). JOCAMR [internet]. 2019 [citado 1 oct 2019]; 7(1): 1-9. Disponible desde: <http://journaljocamr.com/index.php/JOCAMR/article/view/30092/56460>
 22. Rojas N, Espino M, Fernandez M. Patrones de droga resistencia de cepas de *Staphylococcus Aureus* de origen clínico humano. Rev Cubana Med Trop [internet]. 2002 [citado 1 oct 2019]; 1: 53-58. Disponible desde: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602001000100010
 23. Aguayo A, Quezada M, Mella S, Riedel G, Opazo A, Bello H. Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. Rev Chilena Infectol [internet]. 2018 [citado 1 oct 2019]; 35 (1): 7-14. Disponible desde: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v35n1/0716-1018-rci-35-01-0007.pdf>
 24. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. CFSPH [internet]. 2011 [citado 1 oct 2019]. Disponible desde: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/mrsa-es.pdf>
 25. Boucher H, Corey G. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis [internet]. 2008 Jun [citado 1 oct 2019]; 1(46),5: 344–349. Disponible desde: https://academic.oup.com/cid/article-pdf/46/Supplement_5/S344/20907943/46-Supplement_5-S344.pdf
 26. Zorrilla S. Introducción a la metodología de la investigación. 2 ed. México: Ed Cal y Arena; 1998
 27. Katzung B, Trevor A. Farmacología Básica y Clínica. Vol 1. 13th Ed. Mexico DF: Ed Mc Graw Hill; 2016. 776-779.
 28. Brunton Laurence L., Lazo John S., Parker Keith L, editores. “Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica”. 10 ed. New York: Ed McGraw Hill; 2019.
 29. DiPro Joseph, Talbert Robert, Yee Garn, Matzke Gary, Wells Barbara, Posey Michael. “Pharmacoterpy. A Patophysiologic Approach “. 6th ed. New York: Ed McGraw Hill. 2005.

30. Paredes F, Roca J. Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. OFFARM [internet]. 2004 Mar [citado 1 oct 2019]; 23 (3): 116-124. Disponible desde: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-accion-los-antibioticos-perspectiva-medicacion-13059414>
31. CLSI. Estándares de rendimiento para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana; Suplemento Informativo vigésimo sexto. Documento CLSI M100-S26. Wayne, PA: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio; 2016 [citado 2 oct 2019]. Disponible desde: <http://ljzx.cqrmhospital.com/upfiles/201601/20160112155335884.pdf>
32. Sacaquispe R, Velásquez J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Instituto Nacional de Salud; 2012. Disponible desde: https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/manua_l_sensibilidad.pdf
33. Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. Ginebra 2005. 3° ed. Disponible desde: http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf
34. Picazo J. Procedimientos en Microbiología Clínica. Madrid. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2010 [citado 2 oct 2019]. Disponible desde: http://coesantseimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos_SensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf
35. Código de ética y deontología. Lima: Colegio médico del Perú; 2018.
36. Ley N° 29763: Ley Forestal y de fauna silvestre, Art 24. Lima: El Peruano; 2011.
37. Quinto E. Polifenoles totales y capacidad antioxidante en dos especies de cancha piedra (*Phyllanthus niruri* L. y *Phyllanthus urinaria* L.). [Tesis]. Perú: Departamento Académico de Ciencias de los Recursos Naturales Renovables, Universidad nacional agraria de la Selva; 2002.
38. Hernandez A. Hermosilla V. Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en

- Guatemala. [Tesis]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala: 2014. Disponible desde: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/02/878890/efecto-de-la-concentracion-de-saponinas-en-la-actividad-hemolit_BeFli1Q.pdf
39. Instituto Nacional de Salud. "Chancapiedra" planta promisorio. Bol - Inst Nac Salud [internet]. 2006 Jul [citado 8 oct 2019]; 12 (7-8) Disponible desde: <https://repositorio.ins.gob.pe/xmlui/bitstream/handle/INS/669/BOLETIN-2006-jul-agos-213-215.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
40. Devi U, Lawrence B. Antibacterial Activity of *Phyllanthus niruri* growing near mobile towers. Bios Disc [internet]. 2014 [citado 10 oct 2019]; 5(2):221-226. Disponible desde: <https://biosciencediscovery.com/Vol%205%20No.%202%20July%202014/Uma221-226.pdf>
41. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. 2014. Disponible desde: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098_spa.pdf;jsessionid=B10744734A437A37D1111597F99BF82C?sequence=1
42. Valares C. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. [Tesis doctoral]. España: Universidad de Extremadura; 2011. Disponible desde: <https://biblioteca.unex.es/tesis/9788469494332.pdf>

ANEXOS

ANEXO 1. MATRIZ DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES		DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN
Variable independiente	Farmacológica: Oxacilina 1µg	Penicilina semisintética, resistente a la degradación de penicilinasas, activa contra <i>Staphylococcus aureus</i> . ^{28,29}	Se aplicó a un grupo Oxacilina a 1µg	X5	Cualitativa nominal
	Alternativo: Extracto etanólico de <i>Phyllanthus niruri</i>	Solución obtenida a partir de la pulverización de las hojas más la combinación con etanol al 95%.	Se preparará a las siguientes concentraciones: 100 %, 75%, 50%, 25%	RG1 RG2 RG3 RG4	
VD: Efecto bactericida sobre <i>Staphylococcus aureus</i> .		Acción que ejerce el agente antibacteriano para destruir las bacterias ^{30,31}	Considera ³² Efectivo No efectivo	>13 mm <13 m	Cualitativa Nominal

ANEXO 2. INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

N° Repeticiones	Zonas de inhibición (mm)					
	Extracto etanólico de <i>Phyllanthus Niruri</i>				Oxacilina	DMSO
	100%	75%	50%	25%		
1	30	29	29	28	29	0
2	30	29	28	26	32	0
3	30	28	28	27	31	0
4	29	29	29	27	30	0
5	30	29	27	28	30	0
6	30	27	28	26	31	0
7	32	28	28	28	32	0
8	29	28	26	28	33	0
9	29	28	28	27	32	0
10	30	29	28	27	32	0

OXA = Oxacilina 1 mcg en cada disco de sensibilidad

DMSO = Dimetil Sulfoxido al 20%

ANEXO 3. CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

Dónde:

$Z_{\alpha/2}$: 1.96 Para un nivel de confianza del 95%.

Z_{β} : 0.84 Para Una Potencia de Prueba del 80%.

X_1 : 13 mm. Diámetro del halo de inhibición de la Oxacilina.

X_2 : 9mm. Diámetro del halo de inhibición del extracto etanólico del *Phyllanthus niruri*

σ^2 : 1.34.

n: 9

Para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 = 10 repeticiones como significativas


ANEXO 4. CONTRASTE DE HIPÓTESIS EMPLEANDO LA PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Halos es la misma entre categorías de Tratamientos.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,050.

FUENTE: Ficha de recolección de datos de la investigadora, 2020


ANEXO 5. CONSTANCIA DE CERTIFICACIÓN DEL LABORATORIO

**San José**
LABORATORIO CLÍNICO
Calidad y profesionalismo al servicio de tu salud

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha cedido *ad honorem* sus instalaciones, en donde SUSANA NOELIA RODRÍGUEZ SÁNCHEZ, estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Efecto bacteridica del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con oxacilina a 1ug", durante los días 17 al 22 de octubre de 2020, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa,

Se expide la presente a solicitud del estudiante, sólo para fines académicos, a los 27 días del mes de octubre de 2020.


José Luis Cello Quispe
BIÓLOGO - MICROBIOLOGO
C.O.P. 0381

Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo
Sucursales: Los Corales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo
☎ 769999 - 📠 948649844
✉ sanjoselabs@hotmail.com 🌐 www.sanjoselabs.amawebs.com/

ANEXO 6. CONSTANCIA DE AUTENTICACIÓN DE ESPECIE

